

高效表达 Smad2 蛋白的 A549 细胞模型的建立

袁素敬¹, 梁余培¹, 陈勇毅¹, 章康健²

(1. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;
2. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要: 将携带 Smad2-Flag 基因的慢病毒包装系列质粒转染 293T 细胞,进行慢病毒包装。用收集并纯化好的慢病毒感染 A549 细胞,流式分选筛选出 GFP 阳性的细胞,用 Flag 抗体和 Smad2 抗体进行 Western blot 鉴定。流式分选得到的 GFP 阳性的 A549 细胞经 Western blot 鉴定能高效表达外源 Smad2-Flag 融合蛋白,同时空载慢病毒处理的 GFP 阳性细胞并不表达 Smad2-Flag 蛋白。结果表明成功构建了高效表达 Smad2 蛋白的 A549 细胞系,为进一步研究超级干扰素抗肺癌的分子机制奠定了基础。

关键词: A549 细胞株; 慢病毒; GFP; Smad2

中图分类号: Q507 **文献标志码:** A

0 引言

转化生长因子(TGF- β)家族分为两个亚类:骨形态发生蛋白 BMP 和转化生长因子 TGF- β 亚类,其中部分蛋白只在特定的细胞或胚胎发育的特定时期表达,如 GDF8 和 Myostatin;而部分蛋白则在胚胎发育过程中和成体组织中广泛表达,如 TGF- β 1 和 BMP4,这些因子相互协作,在调控细胞的生长、分化、凋亡、迁移和细胞外基质形成的过程中起着重要的作用。TGF- β 信号的起始是通过配体招募并激活受体丝氨酸/苏氨酸激酶,磷酸化 R-Smad (Smad1, 2, 3, 5, 8),活化的 R-Smad 与 Co-Smad (Smad4)结合形成 Smads 复合体,将信号传递到细胞核内。在细胞核内,活化的 Smads 复合体再与相关的转录因子相互作用调控下游靶基因的表达^[1]。越来越多的研究表明 TGF β /Smad2 信号通路与肿瘤发生密切相关,几乎所有的乳腺癌和结肠癌细胞中都发现有该通路成员的突变^[2-5],前列腺癌细胞中也普遍存在 TGF β 信号通路的激活^[6-8]。另有研究表明, TGF β /Smad2 信号通路的激活可以促进

EMT 的发生^[9-13]。

干扰素(Interferon, IFN)是宿主细胞被病原体或者肿瘤侵袭时由宿主细胞产生的一类糖蛋白类细胞因子,干扰素的产生可以激活细胞的免疫系统产生防御机制从而清除病原体或者肿瘤。基于受体的不同,可以将干扰素分为三大类: I 型干扰素如 IFN α , IFN β , IFN- ω , IFN- κ 和 limitin, II 型干扰素 IFN- γ 和 III 型干扰素 IFN- λ 等^[14-17]。目前临床上干扰素主要用于抗病毒治疗,但其临床直接抗癌效果并不显著,并且干扰素直接调节癌症信号机理研究相对其抗病毒机制研究较少。干扰素抗癌信号通路与 TGF- β /Smad2 的关系上研究更少,近年来 Nature 等报道, II 型干扰素 IFN- γ 可以通过活化 Jak-1、STAT-1,上调 Smad7,抑制 Smad3 与 TGF- β 受体的相互作用,从而抑制 TGF- β /Smad2 信号通路^[18-21],提示我们进一步研究超级干扰素的抗癌机理。

超级干扰素(Super Interferon, sIFN)是一种具有自主知识产权的新型基因工程干扰素,由四川辉阳生命工程股份有限公司与中科院刘新垣院士共同研发而成,它与 Amgeng 公司的一种已经下市的

收稿日期: 2012-04-25

基金项目: 浙江理工大学科研启动基金(1116818-Y)

作者简介: 袁素敬(1985-),女,河北沧州人,硕士研究生,研究方向为超级干扰素抗癌机制研究。

通信作者: 章康健,电子邮箱: zhangkangjian@sibcb.ac.cn

干扰素(干复津)的氨基酸序列一致,但碱基序列不同,由于采用了全新的生物技术工艺,使其蛋白质空间构象发生了改变,令其具有更强的抗病毒作用及极低副作用,其抗病毒实验已经进入临床 III 期,同时临床抗癌小样本实验发现该干扰素有显著的直接抗癌效果,其直接抗癌效果已经得到证实^[22],但目前关于超级干扰素直接抗癌机制的研究几乎没有报道。课题组已经开展的早期肺癌细胞 A549 全基因组表达谱芯片分析结果显示,sIFN 可显著地调节 TGF-β/Smad2 信号通路,同时实验验证 sIFN 能显著下调 Smad2 的 mRNA 和蛋白水平,这让我们提出超级干扰素是否通过负调控 Smad2 来起到其抗癌作用。本文主要基于这一背景,开展建立稳定表达 Smad2 蛋白的 A549 细胞模型,这将为 sIFN 抗肺癌的机理的探究奠定一定的研究基础。

1 实验材料和方法

1.1 材料

质粒 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP、pHR-CMV-Δ8.2、pCMV-VSVG 为本组保存,KOD-plus-和 Ligation high 连接酶 Mix (TOYOBO 公司);DNA marker: Trans2K DNA Marker 和 1Kb DNA Ladder (TransGene 公司);限制性内切酶 *Xba*I, *Eco*RI (Fermentas 公司);F-12K 细胞培养基,DMEM 细胞培养基,胰蛋白酶,胎牛血清 (FBS) (Biochrome 公司),Generay 质粒抽提试剂盒 (Generay 公司),Smad2 抗体 (Cell Signaling 公司),Flag 抗体 (Cell Signaling 公司),ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (SIGAMA 公司),IP Lysis Buffer (碧云天公司),Protein Ladder SM1811 (Fermentas 公司),其余试剂均为国产分析纯。

人非小细胞肺癌细胞 A549 和人胚肾细胞 293T 来自于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。*E. coli*. DH5α 菌株感受态细胞为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆及鉴定 NCBI 查询人类 Smad2 基因序列(基因 ID:4087,检索号:NM_005901.4),利用 PCR 法从结肠癌 SW620 细胞中扩增获得 Smad2 基因,

Primer Sense: Smad2-Flag-*Xba*I
CTAGTCTAGAATGTCGTCCATCTTGC-
CATTC

Primer Anti-sense: Smad2-Flag-*Eco*RI
CCGGAATTCTTACTTATCGTCGTCATC-

CTTGTAATCTGACATGCTTGAGCAACGCAC
TGAA。

PCR 反应体系详见表 1。

表 1 PCR 反应体系

Component	Volume/ μ L
10x Buffer for KOD-Plus-	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO ₄	2
10 pmol/ μ L Primer sense	1.5
10 pmol/ μ L Primer anti-sense	1.5
Template-SW620cDNA	1
PCR grade water	33
KOD-Plus- (1.0 U/ μ L)	1
Total reaction volume	50

PCR 反应采用三步法:预变性 94℃,2 mim,变性 94℃,15,退火 55℃,30,延伸 68℃,2 min,循环 30 次,最后延伸 68℃,10 min. 将 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP 载体和 PCR 扩增片段(1 404 bp)分别用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Eco*RI 双酶切,经琼脂糖电泳后回收纯化目的条带,16℃水浴连接 1 h,连接体系:Ligation high 连接酶 mix 5 μ L,pCDH-CMV-MCS-EF1-GFD 片段 5 ng,Smad2 片段 25 ng. 将酶切鉴阳性的重组质粒 pCDH-CMV-Smad2-EF1-GFP 进一步测序确认。

将测序正确的 pCDH-CMV-Smad2-EF1-GFP 和 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP 阳性菌株,在 LB 培养基中 37℃震荡培养过夜,收集菌体,大量抽提质粒 DNA,并用 NanoDrop2000 微量紫外分光光度计对其进行 OD(260/280)值浓度测定,-20℃保存备用。

1.2.2 细胞培养 对人非小细胞肺癌细胞 A549 和人胚肾细胞 293T,按 ATCC 标准方法进行培养。

1.2.3 慢病毒包装

慢病毒包装质粒转染细胞采用磷酸钙法进行。主要步骤如下:转染前 12 h,分别将 3×10⁶ 个 293T 细胞接种到 2 个 10 cm dish 中,细胞培养液为 10 mL 含 10%FBS 的 DMEM,第二天当细胞密度达到 60%~80%时,开始细胞转染。转染体系如下,第 1 管:10 μ g pCDH-CMV-Smad2-EF1-GFP,6 μ g pHR-CMV-Δ8.2,4 μ g pCMV-VSVG,408~418 μ L ddH₂O,62 μ L 2M CaCl₂,第 2 管:10 μ g pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP,6 μ g pHR-CMV-Δ8.2,4 μ g pCMV-VSVG,408~418 μ L ddH₂O,62 μ L 2M CaCl₂,轻轻吹打混匀,分别逐滴加入 500 μ L 2×HBS(PH=7.05),孵育 20 min 后将两管中的混合物分别逐滴加入到 293T 细胞中,之后每隔 12 h 收集上清并更换新鲜 DMEM

培养液, 60 h 后弃掉细胞。收集的上清液经过 0.45 μm Millipore 滤器过滤, 然后分装并置于一80℃保存备用。

1.2.4 感染并筛选稳定细胞克隆

选取生长状态良好的 A549 细胞, 胰蛋白酶消化并计数, 每个 6 cm dish 中种植 50×10^4 cells, 加入 6 mL 24 h 收集的含慢病毒的 293T 细胞上清液, 12 h 后更换新鲜培养液, 24 h 后荧光显微镜镜检。继续培养, 待细胞长满 10 cm dish 后进行流式细胞分选, 筛选出 GFP 阳性细胞。继续培养待用。

1.2.5 Western blot 鉴定稳转株

A549, A549-EV, A549-Smad2 各一个 10 cm dish, PBS 清洗细胞 2 次, 加入 500 μL IP lysis 细胞裂解液裂解细胞, 收集细胞, 剧烈震动充分裂解细胞, 离心 (12 000 r/min, 10 min, 4℃), 取上清加入 40 μL 经 TBS 预处理的 ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, 4℃孵育过夜, 第二天将样品离心 (9 100 r/min, 0.5 min, 4℃), PBS 清洗两次后再次离心, 向沉淀中加入 loading buffer, 100℃, 10 min。按标准方法做 SDS-PAGE 电泳, 电泳完成后, 取下聚丙烯酰胺凝胶, 用甲醇浸泡固定 PVDF 膜, 于冰浴条件下转移 (电流 270 mA, 1.5 h)。以 TBST (100 mmol/L Tris - Cl (pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 洗去 PVDF 膜上残留的转移缓冲液, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h 后, 将膜裁开并分别置于含 Anti-Flag (1:1 000 稀释), Anti-Smad2 (1:1 000) 抗体稀释液中, 室温 1 h, 用 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。再将膜分别置于 goat-anti-rabbit IgG-HRP 抗体稀释液 (1:1 000 稀释), goat-anti-mouse IgG-HRP 抗体稀释液 (1:1 000 稀释) 中, 室温 1 h, 用 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。用滤纸吸干多余的 TBST。取 Western blot 检测试剂盒 (Thermo 公司) 中 1 号液及 2 号液各 1 mL, 混匀, 立即投入 PVDF 膜, 反应 5 min 后, 滤纸吸干多余反应液, 于暗室条件下压上 X 光片, 曝光 2~5 min。

2 结果

2.1 目的基因的克隆及测序

以结肠癌 SW620 细胞的 cDNA 为模板, 成功克隆出 Smad2-flag 基因, 为 1 428 bp (图 1), 测序结果与 NCBI 标准序列比对后确认 PCR 产物序列正确。

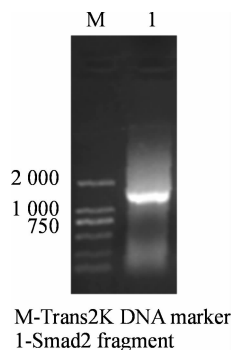


图 1 PCR 克隆产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

2.2 携带 Smad2 的慢病毒包装载体酶切及测序鉴定

分别回收经 *Xba*I 和 *Eco*RI 双酶切得到的 Smad2-flag 片段和 pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP 载体的相应条带, 按表 3 所示的连接体系 16℃水浴连接 1 h, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 再经 *Xba*I 和 *Eco*RI 酶切鉴定, 可见 1 428 bp Smad2-flag 编码序列片段和 7 544 bp 的载体大片段 (图 2)。测序结果亦证实 Smad2 慢病毒包装载体构建成功。

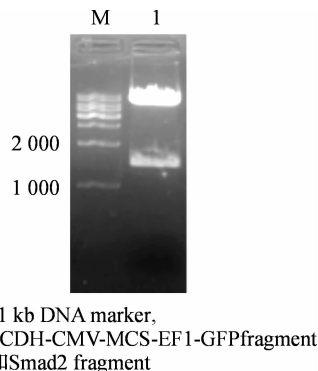


图 2 重组质粒酶切产物琼脂糖电泳鉴定

2.3 稳定表达 Smad2 的 A549 细胞的筛选和鉴定

感染慢病毒的 A549 细胞 24 h 后荧光显微镜镜检, 发出强烈的绿色荧光的细胞 (图 3) 为潜在的阳性克隆, 细胞扩大培养后, 流式细胞仪分选出 GFP 阳性的细胞, 取部分细胞提取总蛋白, 经 ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (SIGAMA 公司) 纯化后, 进行 Western blot 检测, 结果表明成功建立表达 Smad2-flag 的 A549 细胞系 (图 4)。

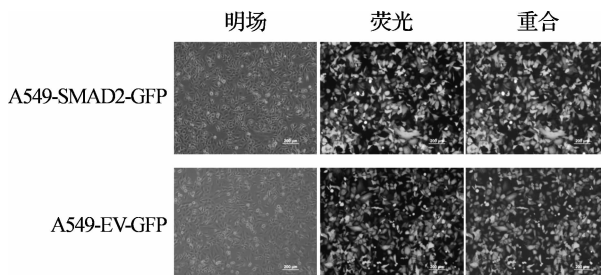


图 3 荧光显微镜观察感染后的 A549 细胞 (100×)

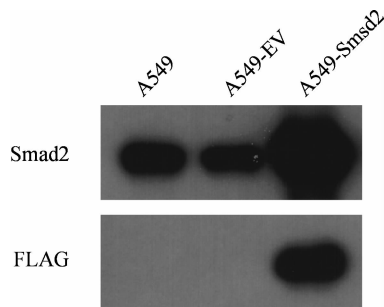


图4 阳性 A549 细胞株中 Smad2-FLAG 融合蛋白表达鉴定

3 讨论

构建稳定表达的细胞系是分析基因功能的常用方法之一。这可以避免外源性质粒转染效果和剂量效应等诸多不足,同时可以更好地模拟体内的条件来研究某基因的功能。如果用携带该外源基因的慢病毒感染细胞后进行筛选,则可能得到外源基因整合到染色体中的稳定表达的细胞。本实验选择三质粒慢病毒包装系统,A549 细胞系作为感染的靶细胞株,实验结果表明获得了高效表达 Smad2 蛋白的细胞株,为以后稳定表达细胞系的筛选奠定基础。

本研究采用磷酸钙-DNA 共沉淀法转染 293T 细胞进行慢病毒的包装,转染试剂毒性低,该细胞可操作性高,转染效率高,转染后细胞死亡率低,有利于慢病毒的包装。慢病毒感染 A549 细胞后,将携带的外源基因稳定整合进 A549 细胞基因组后,A549 细胞即获得外源基因上的显性选择标记 GFP,通过筛选 GFP 阳性的细胞可以得到阳性细胞克隆。Western blot 结果表明筛选出的表达 Smad2 的细胞克隆表达 Flag 标签蛋白,而感染空载对照慢病毒的细胞却不表达 Flag 标签蛋白。结果证实筛选出的 GFP 阳性细胞中 Smad2 基因已稳定整合进细胞染色体。

总之,如前述,本实验结果表明成功获得高效表达 Smad2 蛋白的 A549 细胞系,为进一步研究 Smad2 稳转细胞株是否对超级干扰素抗癌效应产生抗性奠定了实验研究基础,这为揭示超级干扰素是否通过 TGF β /Smad2 信号途径产生抗癌效应提供参考。

参考文献:

[1] Entchev E V, Schwabedissen A, Gonzalez-Gaitan M. Gradient formation of the TGF- β homolog Dpp[J]. Cell, 2000, 103(6): 981-991.
[2] Elahi M, Rakhshan V, Ghasemian N T, et al. Prognostic value of transforming growth factor beta 1 [TGF- β 1]

and matrix metalloproteinase 9 [MMP-9] in oral squamous cell carcinoma[J]. Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals, 2012, 17(1): 21-27.

- [3] Gomes L R, Terra L F, Wailemann R A, et al. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast Cancer cells[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 26.
[4] Imamura T, Hikita A, Inoue Y. The roles of TGF- β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis[J]. Breast Cancer, 2012, 19(2): 118-124.
[5] Lampropoulos P, Zizi-Sermpetzoglou A, Rizos S, et al. Prognostic significance of transforming growth factor beta (TGF- β) signaling axis molecules and E-cadherin in colorectal cancer[J]. Tumour Biology, 2012, 33(4): 1005-1014.
[6] Kyprianou N. Activation of TGF- β signalling in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via deregulation of cell cycle progression and induction of caspase-1 mediated apoptosis: significance in prostate tumorigenesis[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 1999, 2(S3): S18.
[7] Li X, Sterling J A, Fan K H, et al. Loss of TGF- β responsiveness in prostate stromal cells alters chemokine levels and facilitates the development of mixed osteoblastic/osteolytic bone lesions[J]. Molecular Cancer Research: MCR, 2012, 10(4): 494-503.
[8] Mascareno E J, Belashov I, Siddiqui M A, et al. Hexim-1 modulates androgen receptor and the TGF- β signaling during the progression of prostate cancer[J]. The Prostate, 2012, 72(9): 1035-1044.
[9] Hirota M, Watanabe K, Hamada S, et al. Smad2 functions as a co-activator of canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway independent of Smad4 through histone acetyltransferase activity of p300[J]. Cellular Signaling, 2008, 20(9): 1632-1641.
[10] Scheel C, Eaton E N, Li S H, et al. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast[J]. Cell, 2011, 145(6): 926-940.
[11] Gold L I. The role for transforming growth factor- β (TGF- β) in human cancer[J]. Critical Reviews in Oncogenesis, 1999, 10(4): 303-360.
[12] Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, et al. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas[J]. Cancer Research, 1998, 58(23): 5329-5332.

- [13] Kawata M, Koinuma D, Ogami T, et al. TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells [J]. *Journal of Biochemistry*, 2012, 151(2): 205-216.
- [14] Pestka S, Langer J A, Zoon K C, et al. Interferons and their actions[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, 56: 727-777.
- [15] Vilcek J. Novel interferons[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(1): 8-9.
- [16] Liu Y J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors [J]. *Annual Review of Immunology*, 2005, 23: 275-306.
- [17] de Weerd N A, Samarajiwa S A, Hertzog P J. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20053-20057.
- [18] Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway[J]. *Nature*, 1999, 397(6721): 710-713.
- [19] Soto P, Price-Schiavi S A, Carraway K L. SMAD2 and SMAD7 involvement in the post-translational regulation of Muc4 via the transforming growth factor-beta and interferon-gamma pathways in rat mammary epithelial cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(22): 20338-20344.
- [20] Park I K, Letterio J J, Gorham J D. TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4+ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(13): 3283-3290.
- [21] Reardon C, McKay D M. TGF-beta suppresses IFN-gamma-STAT1-dependent gene transcription by enhancing STAT1-PIAS1 interactions in epithelia but not monocytes/macrophages [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4284-4295.
- [22] 李慧玲, 杨冬琴, 欣 曹, 等. 超级干扰素抑制 A 549 增殖诱导其衰老[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(5): 473-478.

Establishment of A549 Cell Model Expressing Smad2 Protein Efficiently

YUAN Su-jing¹, LIANG Yu-pei¹, CHEN Yong-yi¹, ZHANG Kang-jian²

- (1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Life Sciences Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: This paper conducts lentivirus packaging for lentivirus packaging series plasmid transfection 293T cell carrying Smad2-Flag gene; infects A549 cell with lentivirus collected and purified; screens out GFP positive cells with flow sorting and conducts Western blot evaluation with Flag antibody and Smad2 antibody. Through Western blot evaluation, GFP positive A549 cell obtained by flow sorting can efficiently express exogenous Smad2-Flag fusion protein; meanwhile, GFP positive cell of no-load lentivirus processing does not express Smad2-Flag protein. The result shows that A549 cell line expressing Smad2 protein efficiently is established successfully, which lays a foundation for further research on anti-lung cancer molecular mechanism of super interferon.

Key words: A549 cell line; lentivirus; GFP; Smad2

(责任编辑: 许惠儿)